

明 細 書

胚様体形成用容器及び胚様体の形成方法

技術分野

[0001] 本発明は、胚様体を形成する際に用いる胚様体形成用容器及び胚様体の形成方法に関する。

背景技術

[0002] 胚性幹細胞(ES細胞)は、試験管内でも様々な細胞に分化する能力をもつ。ES細胞を試験管内で分化させる方法としては、浮遊培養によって胚様体と呼ばれる擬似的な胚を形成させる方法、ストローマ細胞のように分化と増殖を支持する細胞と共培養する方法が利用されている。ES細胞は、LIF(白血病阻止因子:leukemia inhibitory factor)を加えずに高密度になるまで培養し、シャーレ等の培養容器に接着しないように浮遊培養させて細胞塊を形成すると、その後、様々な種類の細胞に分化することが知られている。浮遊培養で形成された細胞塊は、胚様体(EB)と呼ばれ、浮遊培養は、ES細胞を試験管内で分化させる際に最も広く用いられる方法である。

胚様体は、二重の細胞層から成るボールのような構造をもち、外層は近位内胚葉、内層は胚体外胚葉にあたる。2つの胚葉は、基底膜によって隔てられている。該構造は、マウスの6日胚である円筒胚によく似ており、その限りにおいて胚の正常な発生段階に近い。胚様体においては、中胚葉の誘導も起き、心筋細胞、血液細胞、更には原始的な血管網も発生する。また、胚様体を培養シャーレに付着させて培養を続けると様々な種類の細胞に分化する。この中には、神経細胞、ケラチノサイト、軟骨細胞、脂肪細胞等が含まれる。胚様体の形成を経て分化する細胞は、体細胞に限らず、最近では生殖細胞系譜への分化も起きることが確認されている。このように胚様体の形成はES細胞の多分化能を示すのに都合がよい。

[0003] 胚様体を形成させる為には、ES細胞を培養容器に接着しないように工夫した「ハンギング・ドロップ法」が広く用いられている。ガラス容器のふたから垂れ下がった水滴の中にES細胞を入れて培養するハンギング・ドロップ法1、又は培養容器に予めミネラルオイルを入れておき、その上にES細胞を重層し培養するハンギング・ドロップ法2

が知られている。しかし、ハンギング・ドロップ法1は、垂れ下がった水滴が落ちないように、あるいは重層したミネラルオイルと細胞懸濁液の界面が乱れないようにする必要があり、培養時の調製及び扱いが非常に煩雑であった。また、ミネラルオイルを用いたハンギング・ドロップ法2では、胚様体の形成後に、胚様体を別の培養容器に移すまで検鏡することができず、胚様体の形成過程における研究開発が非常に困難であった。

[0004] ホスホリルコリン基含有重合体は、生体膜に由来するリン脂質類似構造に起因して、血液適合性、補体活性、生体物質非吸着性等の特性を有していることが明らかにされ、当該機能を利用した生体関連材料の開発が盛んに行われている。例えば、特許文献1には、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(以下MP/Cと略記)の製造方法とその重合体が優れた生体適合性を有することが、特許文献2には、MP/Cとメタクリル酸エステルとの共重合体が血小板の粘着・凝集や血漿蛋白質の付着が起こりにくく、医療用材料として有用であることが、特許文献3には、ホスホリルコリン類似基を側鎖に有する共重合体を用いた医療用材料が、特許文献4及び5には、ホスホリルコリン類似基を有する重合体を樹脂表面にコーティングして、優れた生体適合性が得られることが、特許文献6には、ホスホリルコリン類似基を有する重合体をポリエチレンテレフタレートにコーティングして、血球細胞、株細胞、初代培養細胞を分離・回収する分離剤及び分離・回収方法がそれぞれ開示されている。

しかし、ES細胞を浮遊培養するにあたり、ホスホリルコリン類似基を有する重合体を被覆した容器を使用することについては知られていない。

特許文献1:特開昭54-36025号公報

特許文献2:特開平3-39309号公報

特許文献3:特開平9-183819号公報

特許文献4:持表平6-502200号公報

特許文献5:特表平7-502053号公報

特許文献6:特開2002-098676号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

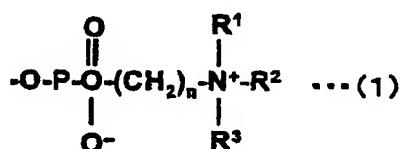
[0005] 本発明の目的は、煩雑な手法を用いることなく、容易にES細胞より胚様体を形成するために使用する胚様体形成用容器を提供することにある。

本発明の別の目的は、煩雑な手法を用いることなく、容易にES細胞を培養し、胚様体を形成できる胚様体の形成方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明によれば、胚性幹細胞(ES細胞)を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器であって、ES細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、式(1)で表されるホスホリルコリン類似基(以下、PC類似基と略記)を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器が提供される。

[化1]



(式中、R¹、R²及びR³は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1〜6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。nは1〜4の整数である。)

また本発明によれば、ES細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、前記式(1)で表されるPC類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器を準備する工程(A)と、胚様体形成用容器内において、胚様体を形成するためにES細胞を浮遊培養する工程(B)とを含む胚様体の形成方法が提供される。

更に本発明によれば、ES細胞を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器の使用であって、該容器のES細胞を浮遊培養するための領域を形成する表面に、前記式(1)で表されるPC類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器の使用が提供される。

発明の効果

[0007] 本発明の胚様体の形成方法は、本発明の胚様体形成用容器を用いて培養するので、従来のハンギング・ドロップ法のES細胞の培養における、煩雑な手法を用いるこ

となく、容易にES細胞より胚様体を効率良く形成することができる。また本発明の胚様体形成用容器は、所望表面にPC類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備えるので、ES細胞より胚様体を形成する際に有用である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、実施例2-1で形成した胚様体の位相差顕微鏡写真の写しである。

[図2]図2は、未処理プレートを用いた比較例2-1で培養した胚様体の位相差顕微鏡写真の写しである。

[図3]図3は、比較例2-2で実施したハンギング・ドロップ法で形成した胚様体の位相差顕微鏡写真の写しである。

発明を実施するための最良の形態

[0009] 以下本発明を更に詳細に説明する。

本発明の胚様体形成容器は、ES細胞を浮遊培養させ胚様体を形成させるために使用する容器である。該容器は、ES細胞を浮遊培養する領域を形成する表面に、前記式(1)で表されるPC類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備えることを特徴とする。

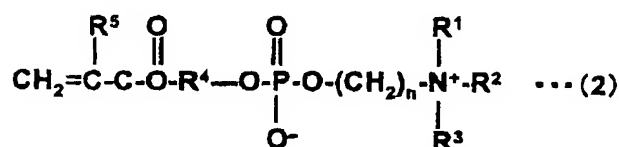
前記式(1)において R^1 、 R^2 及び R^3 は、同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1〜6の、アルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。

前記炭素数1〜6のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、シクロヘキシル基、フェニル基等が挙げられる。前記炭素数1〜6のヒドロキシアルキル基としては、例えば、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基、4-ヒドロキシブチル基、5-ヒドロキシペンチル基、6-ヒドロキシヘキシル基等が挙げられる。

[0010] 前記容器表面に式(1)で表されるPC類似基を有する化合物を用いて被覆層を形成するには、例えば、PC類似基を有する化合物を含む反応試薬を、容器の所望表面に化学修飾法により固定する方法、PC類似基を有する重合体を容器の所望表面にコーティング法により固定する方法、PC類似基を有する重合体を容器の所望表面に化学結合法により固定する方法が挙げられる。特に、前記コーティング法は、簡便に、PC類似基を有する化合物による均一な被覆層を形成できるので好ましい。

前記PC類似基を有する重合体は、式(1)で表されるPC類似基を有するポリマーであれば良く、例えば、式(2)で表されるPC類似基含有単量体(M)の単独重合体、及び該単量体(M)と他の単量体との共重合体の少なくとも1種が好ましく挙げられる。

[0011] [化2]



式(2)中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び n は式(1)と同様であり、 R^4 は炭素数1～6のアルキル基を示し、 R^5 は水素原子又はメチル基を示す。

[0012] 式(2)で表される単量体(M)としては、例えば、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、3-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、4-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、5-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、6-((メタ)アクリロイルオキシ)ヘキシルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリエチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリプロピルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリブチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリシクロヘキシルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリフェニルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ヘキシルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート等が挙げられる。

[0013] 中でも2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェートが好ましく、さらに2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチルー2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート(2-メタアクリロイルオキシエチルホスホリルコリンともいう。以下、MPC

と略記)が入手性及びES細胞の培養容器への接着を防止でき、胚様体形成能を発現させる点でより好ましい。

[0014] 前記共重合体を得るための他の単量体としては、疎水性単量体、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート、4-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート等の水酸基含有(メタ)アクリレート;アクリル酸、メタクリル酸、スチレンスルホン酸、(メタ)アクリロイルオキシホスホン酸、2-ヒドロキシ-3-(メタ)アクリルオキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド等のイオン性基含有単量体、(メタ)アクリルアミド、アミノエチルメタクリレート、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート等の含窒素単量体、ポリエチレングリコール(メタ)アクリレート、グリシジル(メタ)アクリレート又はこれらの2種以上の混合物等が挙げられる。

[0015] 前記疎水性単量体としては、例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、ラウリル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート等の直鎖又は分岐アルキル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート等の環状アルキル(メタ)アクリレート、ベンジル(メタ)アクリレート、フェノキシエチル(メタ)アクリレート等の芳香族(メタ)アクリレート、ポリプロピレングリコール(メタ)アクリレート等の疎水性ポリアルキレングリコール(メタ)アクリレート、スチレン、メチルスチレン、クロロメチルスチレン等のスチレン系単量体、メチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体又はこれらの2種以上の混合物等が挙げられる。

[0016] 前記共重合体において、疎水性単量体に由来する構成単位は、共重合体の構成単位中90モル%以下が好ましく、特に20〜90モル%が好ましい。疎水性単量体に由来する構成単位を有する共重合体は、耐溶出性が向上するが、疎水性単量体に由来する構成単位が90モル%を超えると、容器表面における式(1)で表されるPC類似基の被覆量が少なくなり、被覆の効果が十分に発揮できなくなる恐れがあるので好ましくない。

上述の疎水性単量体以外の単量体に由来する構成単位が共重合体に含まれると耐溶出性が向上し、培地等に界面活性剤、有機溶剤を使用できることになるので好

ましい。

例えば、グリシジル(メタ)アクリレートを用いた共重合体は、容器表面のアミノ基、カルボキシル基等と反応させることができ、該共重合体を、所望表面に化学的に結合させることができる。

前記共重合体において、疎水性単量体以外の単量体に由来する構成単位の割合は、70モル%以下が好ましい。

[0017] 式(2)で表されるPC類似基含有単量体(M)の単独重合体、又は該単量体(M)と他の単量体との共重合体の分子量は、重量平均分子量で通常5000〜5000000であり、ES細胞の培養容器への接着を有効に防止でき、胚様体形成能を発現させ、重合体の耐溶出性を向上させる点から100000〜2000000が好ましい。

[0018] 本発明において前記被覆層の被覆量は、表面分析方法により評価できる。具体的には、X線光電子分光分析によって測定したスペクトルに基づいて、リンのピーク面積Pと炭素のピーク面積Cの比、即ちP/C値で評価できる。胚様体形成能を発現させるためのP/C値は、0.002〜0.3の範囲が好ましく、0.01〜0.2の範囲がより好ましい。

[0019] 本発明の胚様体形成用容器は特に限定されないが、例えば、細胞培養用ディッシュ、細胞培養用マルチディッシュ、細胞培養用プレート、細胞培養用バック、細胞培養用フラスコ等の既存の細胞培養容器が挙げられる。適度な大きさの胚様体を得るために、更に望ましくは、細胞培養用ディッシュ又は細胞培養用プレートが好ましい。

胚様体形成用容器の材質は特に限定されず、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、アクリル樹脂、ガラス、金属等が挙げられる。また、前記被覆層を形成する容器表面は、コロナ処理等の表面加工を施した表面であることが好ましい。

[0020] 前記単量体(M)の単独重合体、及び単量体(M)と他の単量体との共重合体の少なくとも1種を用いて容器表面の所望箇所に被覆層を形成するには、例えば、前記重合体を、水、エタノール、メタノール、イソプロパノール等に単独に溶解あるいは、水とエタノール、エタノールとイソプロパノール等の混合溶剤に溶解した後に、容器を浸漬あるいは、容器に重合体溶液をスプレーする方法等によりコーティングすることで実

施できる。

また、前記共重合体が、エポキシ基、イソシアネート基、スクシンイミド基、アミノ基、カルボキシル基又は水酸基等の化学結合可能な官能基を有する場合には、容器表面のアミノ基、カルボキシル基又は水酸基と化学反応させるために、共重合体を含む溶液を化学結合可能な官能基が反応しない溶剤に溶解し、容器表面と化学結合させ被覆層を形成した後に、未反応の重合体を洗浄除去する方法によっても胚様体形成用容器を得ることができる。

- [0021] 本発明の胚様体の形成方法は、ES細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、前記式(1)で表されるPC類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器を準備する工程(A)と、胚様体形成用容器内において、胚様体を形成するためにES細胞を浮遊培養する工程(B)とを含む。

工程(A)において準備する容器は、上述の本発明の胚様体形成用容器が挙げられ、上述した例示した容器は全て工程(A)で準備する容器に適用することができる。

- [0022] 工程(B)においてES細胞を浮遊培養するには、例えば、フィーダー細胞上で培養した未分化状態のES細胞を、前記胚様体形成用容器内で公知の方法や条件等に従って浮遊培養することにより行なうことができる。この際、胚様体形成用容器内の培養液は、静置状態でも、緩やかに振とうしても良い。

前記培養液を構成する培地としては、従来のハンギング・ドロップ法等に用いられている各種成長因子、例えば、Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM培地)等を用いることができる。

前記培養液中のES細胞の濃度は、工程(A)により準備する胚様体形成用容器の大きさや形態等によって異なるが、通常 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mLである。特に、胚様体形成用容器として、96穴プレートを用いる場合の前記ES細胞の濃度は、 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/mLであることが、再現性良く胚様体を形成できるので好ましい。

実施例

- [0023] 以下、実施例及び比較例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。尚、例中の容器表面におけるP/C値は以下の方法に従って算出

した。

<胚様体形成用容器表面のP/C値の測定方法>

X線光電子分光分析器(商品名「ESCA-3300」、島津製作所製)を用いて、X線照射角が90°の各元素のスペクトルを測定し、リン元素及び炭素元素のピーク面積から、下記式によりP/C値を算出した。

$$P/C = A_p(\text{リン元素のピーク面積}) / A_c(\text{炭素元素のピーク面積})$$

[0024] 合成例1

MPC 35.7g及びn-ブチルメタクリレート(BMA)4.3g(MPC/BMA=80/20(モル比))をエタノール160gに溶解して4つロフラスコに入れ、30分間窒素を吹き込んだ後、60°Cでアゾビスイソブチロニトリル0.82gを加えて8時間重合反応させた。重合液を3Lのジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿をろ化し、48時間室温で真空乾燥を行って粉末29.6gを得た。以下に示す条件のGPCにより測定した重量平均分子量は153000であった。¹H-NMRにて組成分析した結果、MPC/BMA=80/20(モル比)であった。これを共重合体(A)とする。

<GPCの測定条件>

(1)試料:0.5重量%臭化リチウムを含むクロロホルム/メタノール(6/4(体積比))混合溶媒に試料を溶解し、0.5重量%の重合体溶液を調製した。試料溶液の使用量は20Lである。

(2)カラム:PLgel 5 μ m MIXEDC-C、2本直列(ポリマー・ラボラトリー社製)、カラム温度は40°C、東ソー社製のインテグレーター内蔵分子量計算プログラム(SC-8020用GPCプログラム)にて調製した。

(3)溶出溶媒:0.5重量%臭化リチウムを含むクロロホルム/メタノール(6/4(体積%))混合溶媒、流速は1.0mL/分である。

(4)検出:示差屈折計、

(5)標準物質:ポリメチルメタクリレート(PMMA)(ポリマー・ラボラトリー社製)。

[0025] 合成例2

MPC 38.0g及びグリシジルメタクリレート2.0g(GMA)(MPC/GMA=90/10(モル比))をイソプロパノール358gに溶解して4つロフラスコに入れ、30分間窒素を吹き込

んだ後、60℃で20重量%の α -ブチルパーオキシピバレート¹のトルエン溶液2.18gを加えて5時間重合反応させた。重合液を3Lのジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、4.8時間室温で真空乾燥を行って粉末28.4gを得た。¹H-NMRにて組成分析した結果、MPC/GMAは90/10(モル比)であった。合成例1と同様にGPCにより測定した重量平均分子量は53000であった。これを共重合体(B)とする。

[0026] 合成例3

MPC 12.6g、BMA 8.6g及びGMA 6.0g(MPC/BMA/GMA=30/40/30(モル比))をイソプロパノール358gに溶解して4つロフラスコに入れ、30分間窒素を吹き込んだ後、60℃で20重量%の α -ブチルパーオキシピバレート¹のトルエン溶液2.18gを加えて5時間重合反応させた。重合液を3Lのジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48時間室温で真空乾燥を行って粉末28.4gを得た。¹H-NMRにて組成分析した結果は、MPC/BMA/GMA=30/40/30(モル比)であった。合成例1と同様にGPCにより測定した重量平均分子量は42000であった。これを共重合体(C)とする。

[0027] 実施例1-1

合成例1で合成した共重合体(A)0.5gをエタノール100mLに溶解し、共重合体溶液を調製した。U底ポリスチレン製96穴プレートの各ウェルに前記共重合体溶液0.3mLを入れた後、各ウェルから共重合体溶液を吸引し除去した。50℃で5時間減圧下で乾燥することにより胚様体形成用容器(A)を作製した。

胚様体形成容器(A)における共重合体(A)被覆層を有するウェル内表面のP/C値を測定した。結果を表1に示す。

[0028] 実施例1-2

U底ポリスチレン製96穴プレートを空気中で、照射エネルギー1J/cm²の条件においてコロナ処理して表面にカルボキシル基を生成させた。合成例2により合成した共重合体(B)0.5gをイソプロパノール100mLに溶解し、共重合体溶液を調製した。コロナ処理したU底96穴プレートの各ウェルに前記共重合体溶液0.3mLを入れた後、各ウェルから共重合体溶液を吸引し除去した。60℃で3時間、プレート表面のカルボ

キシル基と共重合体中のエポキシ基とを反応させた。0.2Mチオ硫酸ナトリウム水溶液を、各ウェルに0.3mL入れて、25℃、24時間の条件で未反応のエポキシを開環させた。蒸留水で各ウェルを3回洗浄した後、50℃で5時間減圧下で乾燥することにより胚様体形成用容器(B)を作製した。

胚様体形成容器(B)における共重合体(B)被覆層を有するウェル内表面のP/C値を測定した。結果を表1に示す。

[0029] 実施例1-3

共重合体(B)の代わりに合成例3により合成した共重合体(C)を用いた以外は実施例1-2と同様に行い、胚様体形成用容器(C)を作製した。

胚様体形成容器(C)における共重合体(C)被覆層を有するウェル内表面のP/C値を測定した。結果を表1に示す。

[0030] 比較例1

未処理のU底ポリスチレン製96穴プレートのウェル内表面のP/C値を測定した。結果を表1に示す。

[0031] [表1]

	容器	P/C比
実施例1-1	胚様体形成用容器(A)	0.038
実施例1-2	胚様体形成用容器(B)	0.074
実施例1-3	胚様体形成用容器(C)	0.038
比較例1	未処理プレート	0.000

[0032] 実施例2-1

下記調製法で調製した 2×10^4 cells/mLのマウスES細胞の懸濁液を、実施例1-1で作製した胚様体形成用容器(A)に各ウェル0.2mLずつ播種した。37℃、5%CO₂の条件下で5日間培養した後に、位相差顕微鏡にて胚様体形成状態を観察した。結果を表2に示す。また、位相差顕微鏡写真の写しを図1に示す。

表2における胚様体形成の評価は、分化するのに十分な大きさの胚様体が形成された場合をA、胚様体は形成されたが大きさが十分でない場合をB、胚様体が形成されなかった場合をCとした。

[0033] <マウスES細胞の懸濁液の調製法>

(1)フィーダー細胞の培養

フィーダー細胞としてSIMマウスの繊維芽細胞(以下、STO細胞と略記)を用いた。STO細胞は、25units/mLペニシリン、25g/mLストレプトマイシン及び10体積%非動化处理したウシ胎児血清(FCS)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium(以下DMEM培地と略記、Gibco社製)を用い培養した。培養したSTO細胞を10g/mLのマイトマイシンC溶液(Sigma社製)で3時間処理した後、細胞懸濁液とした。STO細胞の懸濁液を各ウェルに 5×10^5 cellsになるように6穴マルチディッシュに播種した。37°C、5%CO₂の条件下で16時間培養してフィーダー細胞を調製した。

(2)マウスES細胞の培養

ES細胞として129VマウスES細胞を用いた。ES細胞の培地は、15%KnockOut(登録商標) serum replacement(KSR: Gibco社製)、1mMピルビン酸ナトリウム(Gibco社製)、0.1mM nonessential amino acids(Gibco社製)、0.1mM 2-メルカプトエタノール(Sigma社製)、25units/mL ペニシリン、25g/mL ストレプトマイシン及び1000units/mLのmurine leukemia inhibitory factor(mLIF: Chemicon社製)を含むDMEM培地(以下ES培地と略記)とした。前記(1)で調製したフィーダー細胞上に 2×10^5 cell/ウェルのES細胞を播種した。37°C、5%CO₂の条件下で3日間、マウスES細胞を培養した。

前記(2)で培養したマウスES細胞を0.1%トリプシン-EDTAで常法により剥がした後、15%FCS、0.1mM 2-メルカプトエタノール(Sigma社製)、25units/mL ペニシリン及び25g/mL ストレプトマイシンを含むIMDM培地(Gibco社製、mLIFを含まない)に懸濁して、 2×10^4 cells/mLのマウスES細胞の懸濁液を調製した。

[0034] 実施例2-2及び2-3

胚様体形成用容器(A)の代わりに、実施例2-2及び実施例2-3で調製した胚様体形成用容器(B)又は胚様体形成用容器(C)を用いた以外は、実施例2-1と同様に実験を行った。結果を表2に示す。

[0035] 比較例2

胚様体形成用容器(A)の代わりに、未処理のポリスチレン製96穴プレートを用いた以外は、実施例2-1と同様に実験を行った。結果を表2に示す。また、位相差顕微鏡

にて胚様体形成状態を観察した。この位相差顕微鏡写真の写しを図2に示す。

[0036] 比較例2-2

平底ポリスチレン製96穴プレートの各ウェルにリン酸緩衝液130 μ L及びミネラルオイル200 μ Lを予め入れておき、ここに前記調製した 2×10^4 cells/mLのマウスES細胞の懸濁液を50 μ L播種した。37°C、5%CO₂の条件下で5日間培養した後に、形成された胚様体をU底ポリスチレン製96穴プレートに移した。次いで、位相差顕微鏡にて実施例2-1と同様に観察を行なった。結果を表2に示す。また、位相差顕微鏡写真の写しを図3に示す。

[0037] 比較例2-3

胚様体形成用容器(A)の代わりに、スミロンセルタイトスフェロイド(96穴プレート、登録商標、住友ベークライト社製)を用いた以外は、実施例2-1と同様に実験を行った。結果を表2に示す。

[0038] [表2]

	容器	胚様体の形成
実施例 2-1	胚様体形成用容器(A)	A
実施例 2-2	胚様体形成用容器(B)	A
実施例 2-3	胚様体形成用容器(C)	A
比較例 2-1	未処理プレート	C
比較例 2-2	ハンギング・ドロップ法	B
比較例 2-3	スフェロイドプレート	B

[0039] 実施例3-1～実施例3-3

実施例2-1～2-3で得られた胚様体を0.1mLの培地ごと吸出し、下記調製法にて調製したゼラチンコートディッシュに移した。培地交換は3日毎に半量の交換を行った。37°C、5%CO₂の条件下で7日間培養した後に位相差顕微鏡にて観察した。結果を表3に示す。

表3における心筋への分化評価は、拍動している心筋が観察された場合をA、拍動している心筋が僅かに観察された場合をB、作業が行えなかった場合をCとした。

[0040] <ゼラチンコートディッシュの調製法>

121°C、20分間オートクレーブ滅菌を施した0.1重量%のゼラチン水溶液を培養

用24穴マルチディッシュに均一に加えた。冷蔵保存を行い、使用直前に、アスピレーターにてゼラチン溶液を吸引した。15%FCS、0.1mM 2-メルカプトエタノール (Sigma社製)、25units/mL ペニシリン及び25g/mL ストレプトマイシンを含むIMDM 培地(Gibco社製、mLIFを含まない)を各ウェルに1mLずつ加えた。

[0041] 比較例3-1

比較例2-1のプレート底部に接着した細胞をゼラチンコートディッシュに移そうとしたが移せなかった。

[0042] 比較例3-2及び比較例3-2

比較例2-2(比較例3-2)、比較例2-3(比較例3-3)で得られた胚様体を用いた以外は、実施例3-1と同様に実験を行った。結果を表3に示す。

[0043] [表3]

	容器	心筋への分化
実施例3-1	胚様体形成用容器(A)	A
実施例3-2	胚様体形成用容器(B)	A
実施例3-3	胚様体形成用容器(C)	A
比較例3-1	未処理プレート	C
比較例3-2	ハンギング・ドロップ法	B
比較例3-3	スフェロイドプレート	B

[0044] 表1より、実施例1-1〜1-3においてP/C値が0.038〜0.074であることから、胚様体形成用容器(A)〜(C)は、PC類似基を有する重合体による被覆層により被覆されていることがわかった。表2より、胚様体形成用容器(A)〜(C)でマウスES細胞を培養すると、良好に胚様体を形成できることがわかった。表3より、胚様体形成用容器(A)〜(C)で形成された、マウスES細胞からの胚様体は、心筋への分化能が高いことがわかった。

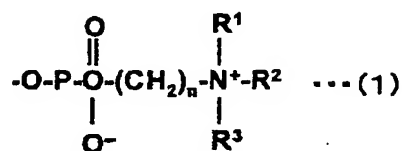
また、図1より、本発明にかかる胚様体形成用容器を用いることにより、分化するのに十分な大きさの胚様体が形成されることがわかった。図2より、未処理のポリスチレン製容器の場合は胚様体が形成されないことがわかった。図3より、ハンギング・ドロップ法で形成した胚様体は、大きさが十分でないことがわかった。

請求の範囲

- [1] 胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器であって

、
胚性幹細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、式(1)で表されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器。

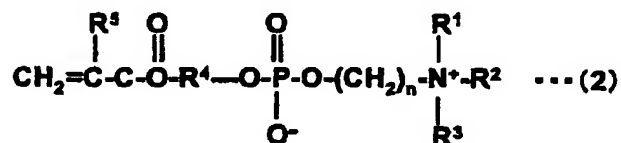
[化1]



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。 n は1～4の整数である。)

- [2] ホスホリルコリン類似基を有する化合物が、式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体(M)の単独重合体、及び該単量体(M)と他の単量体との共重合体の少なくとも1種である請求項1の胚様体形成用容器。

[化2]



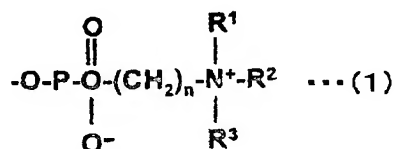
(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を、 R^4 は炭素数1～6のアルキル基を、 R^5 は水素原子又はメチル基を示す。 n は1～4の整数である。)

- [3] 前記被覆層を形成した容器表面における、X線高電子分光分析によって測定したスペクトルに基づくリン元素の量Pと炭素元素の量Cとの比(P/C)が、0.002～0.3である請求項1の胚様体形成容器。

- [4] 胚性幹細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、式(1)で表

されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器を準備する工程(A)と、

[化3]

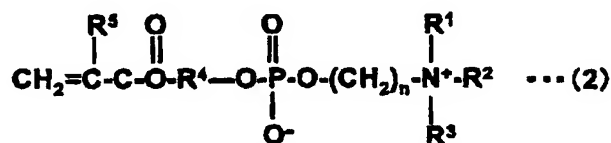


(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1〜6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。 n は1〜4の整数である。)

胚様体形成用容器内において、胚様体を形成するために胚性幹細胞を浮遊培養する工程(B)とを含む胚様体の形成方法。

- [5] ホスホリルコリン類似基を有する化合物が、式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体(M)の単独重合体、及び該単量体(M)と他の単量体との共重合体の少なくとも1種である請求項4の形成方法。

[化4]



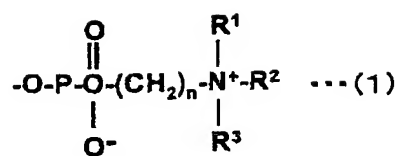
(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1〜6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を、 R^4 は炭素数1〜6のアルキル基を、 R^5 は水素原子又はメチル基を示す。 n は1〜4の整数である。)

- [6] 前記被覆層を形成した容器表面における、X線高電子分光分析によって測定したスペ

クトルに基づくリン元素の量Pと炭素元素の量Cとの比(P/C)が、0.002〜0.3である請求項4の形成方法。

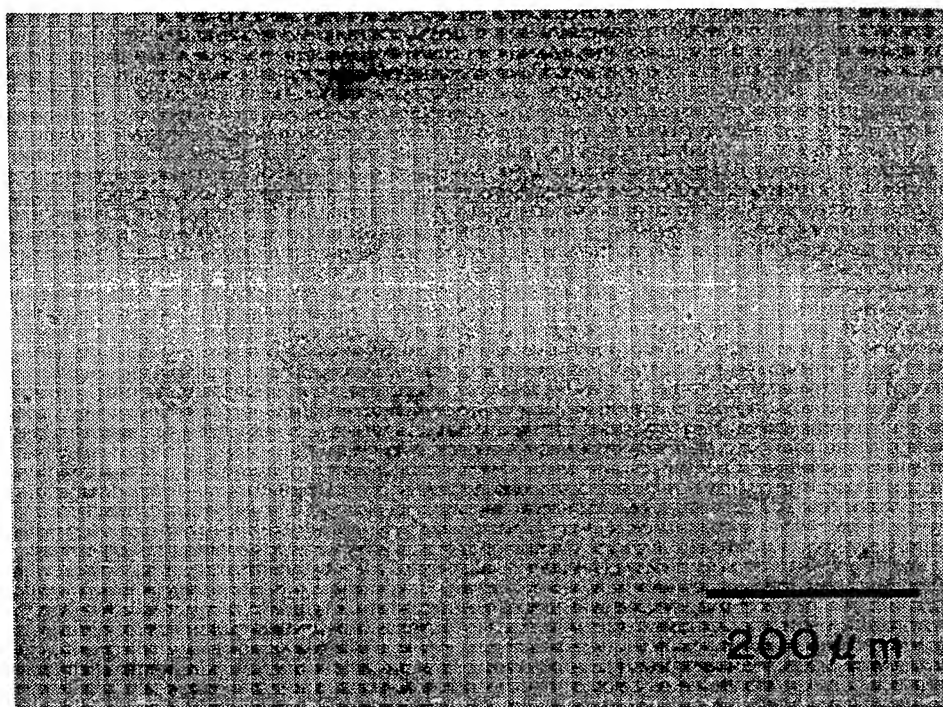
- [7] 胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器の使用であって、該容器の胚性幹細胞を浮遊培養するための領域を形成する表面に、式(1)で表されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器の使用。

[化5]

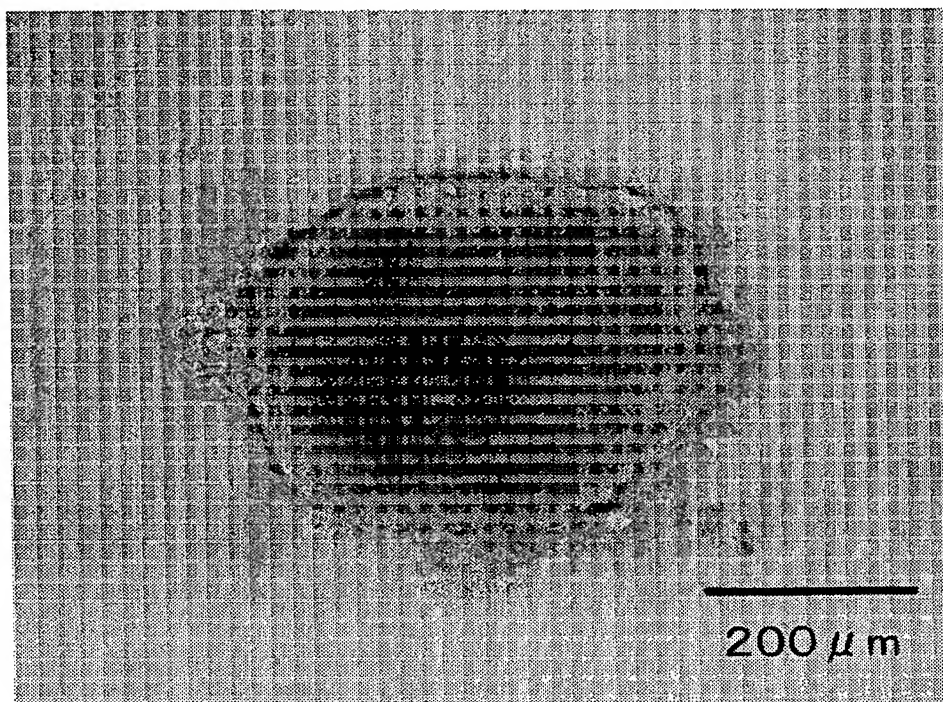


(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であつて、水素原子、炭素数1〜6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。 n は1〜4の整数である。)

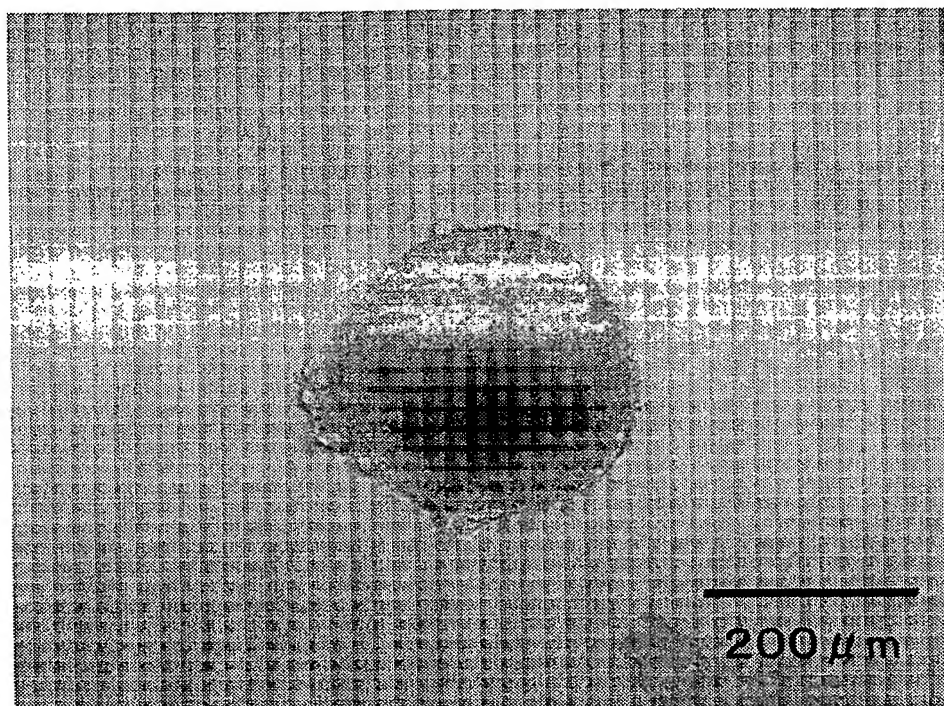
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M3/00, C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M3/00, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY, CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-543828 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT CO. OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM), 24 December, 2002 (24.12.02), Full text & WO 00/70021 A2 & EP 1183329 A	1-7
Y	ISHIHARA, K. et al., "Inhibition of fibroblast cell adhesion on substrate by coating with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers", J.Biomater.Sci.Polymer Edn, (1999), Vol.10, pages 1047 to 1061, full text	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 August, 2004 (09.08.04)

Date of mailing of the international search report
24 August, 2004 (24.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008970

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IWASAKI, Y. et al., "The effect of the chemical structure of the phospholipid polymer on fibronectin adsorption and fibroblast adhesion on the gradient phospholipid surface", Biomaterials, (1999), Vol.20, pages 2185 to 2191, full text	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12M 3/00, C12N 5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12M 3/00, C12N 5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY, CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-543828 A, (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM), 2002.12.24, 全文 & WO 00/70021 A2 & EP 1183329 A	1-7
Y	ISHIHARA, K. et al., "Inhibition of fibroblast cell adhesion on substrate by coating with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers", J. Biomater. Sci. Polymer Edn, (1999), Vol. 10, pp. 1047-1061, 全文	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.08.2004

国際調査報告の発送日

24.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4B

3334

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	IWASAKI, Y. et al., "The effect of the chemical structure of the phospholipid polymer on fibronectin adsorption and fibroblast adhesion on the gradient phospholipid surface" Biomaterials, (1999), Vol. 20, pp. 2185-2191, 全文	1-7

特許協力条約

PCT

REC'D 17 NOV 2005

WIPO

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

（法第12条、法施行規則第56条）
（PCT36条及びPCT規則70）

出願人又は代理人 の書類記号 10204	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP2004/008970	国際出願日 (日.月.年) 25.06.2004	優先日 (日.月.年) 25.06.2003
国際特許分類(IPC) Int.Cl. ⁷ C12M3/00, C12N5/06		
出願人(氏名又は名称) 日本油脂株式会社		

- この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。
法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- この報告には次の附属物件も添付されている。
 - ☒ 附属書類は全部で 5 ページである。
 - ☒ 補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面の用紙(PCT規則70.16及び実施細則第607号参照)
 - ☐ 第I欄4.及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙
 - ☐ 電子媒体は全部で _____ (電子媒体の種類、数を示す)。
配列表に関する補充欄に示すように、電子形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。
(実施細則第802号参照)

4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- ☒ 第I欄 国際予備審査報告の基礎
- ☐ 第II欄 優先権
- ☐ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- ☐ 第IV欄 発明の単一性の欠如
- ☒ 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- ☐ 第VI欄 ある種の引用文献
- ☐ 第VII欄 国際出願の不備
- ☐ 第VIII欄 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.04.2005	国際予備審査報告を作成した日 01.11.2005	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 伏見 邦彦	4B 3334
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(2005年4月)

第 I 欄 報告の基礎

1. 言語に関し、この予備審査報告は以下のものを基礎とした。

- ☒ 出願時の言語による国際出願
- ☐ 出願時の言語から次の目的のための言語である _____ 語に翻訳された、この国際出願の翻訳文
- ☐ 国際調査 (PCT 規則 12.3(a) 及び 23.1(b))
- ☐ 国際公開 (PCT 規則 12.4(a))
- ☐ 国際予備審査 (PCT 規則 55.2(a) 又は 55.3(a))

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第 6 条 (PCT 14 条) の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書

第 1, 2, 4, 6-14 _____ ページ、出願時に提出されたもの
 第 3, 5 _____ ページ*, 2005.04.28 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 請求の範囲

第 3, 6 _____ 項、出願時に提出されたもの
 第 _____ 項*, PCT 19 条の規定に基づき補正されたもの
 第 1, 2, 4, 5, 7 _____ 項*, 2005.04.28 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ 項*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 図面

第 1-3 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの
 第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☐ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT 規則 70.2(c))

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に "superseded" と記入されることがある。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-7	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-7	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-7	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則 70.7)

文献1: JP 2002-543828 A,(YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM), 2002.12.24

文献2: ISHIHARA,K. et al., J.Biomater.Sci.Polymer Edn, (1999), Vol.10, pp.1047-1061

文献3: IWASAKI,Y. et al., Biomaterials, (1999), Vol.20, pp.2185-2191

文献1には、胚性幹細胞を、当該胚性幹細胞が付着しない表面を有する容器内で培養することにより、胚様体を調製する方法、及び当該胚様体を調製する容器が記載されている。

文献2には、PET(polyethylene telephthalate)等からなる基材への細胞の接着を防ぐための、poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)-co-n-bucyl methacrylate]copolymer(以下、PMB 共重合体という)からなる、前記基材を被覆した表面が記載されている。

文献3には、PE(polyethylene)等からなる基材への細胞の接着を防ぐための、poly[6-methacryloyloxyhexyl phosphorylcholine(MHPC)](以下、MHPC 単独重合体という)、及び、poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)](以下、MPC 単独重合体という)からなる、前記基材を被覆した表面が記載されている。

請求の範囲1-7に記載の発明は、文献1と文献2により進歩性を有さない。

文献1に記載の胚様体を調製する容器は、胚性幹細胞が付着しない表面を有するところ、細胞が接着しにくい様に、基材に PMB 共重合体を被覆した表面は文献2に記載のとおり公知である。

したがって、文献1に記載の胚様体を調製する容器の表面として、PMB 共重合体を被覆した表面を用い、さらに PMB 共重合体中の MPC の割合を調節することも当業者には容易である。

請求の範囲1-7に記載の発明は、文献1と文献3により進歩性を有さない。

文献1に記載の胚様体を調製する容器は、胚性幹細胞が付着しない表面を有するところ、細胞が接着しにくい様に、基材に MHPC 単独重合体、又は MPC 単独重合体を被覆した表面は、文献3に記載のとおり公知である。

したがって、文献1に記載の胚様体を調製するための容器の表面として、MHPC 単独重合体、又は MPC 単独重合体によって被覆した表面を用いることは当業者には容易である。

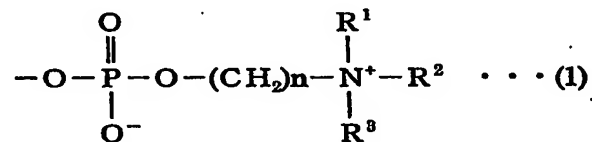
[0005] 本発明の目的は、煩雑な手法を用いることなく、容易にES細胞より胚様体を形成するために使用する胚様体形成用容器を提供することにある。

本発明の別の目的は、煩雑な手法を用いることなく、容易にES細胞を培養し、胚様体を形成できる胚様体の形成方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明によれば、胚性幹細胞(ES細胞)を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器であって、ES細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、式(1)で表されるホスホリルコリン類似基(以下、PC類似基と略記)を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器が提供される。

[化1]



(式中、R¹、R²及びR³は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。nは1～4の整数である。)

また本発明によれば、ES細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、前記式(1)で表されるPC類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器を準備する工程(A)と、胚様体形成用容器内において、胚様体を形成するためにES細胞を浮遊培養する工程(B)とを含む胚様体の形成方法が提供される。

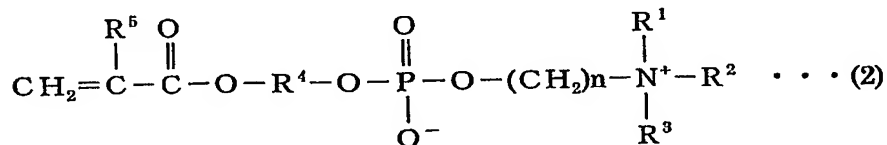
更に本発明によれば、ES細胞を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器の使用であって、該容器のES細胞を浮遊培養するための領域を形成する表面に、前記式(1)で表されるPC類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器の使用が提供される。

発明の効果

[0007] 本発明の胚様体の形成方法は、本発明の胚様体形成用容器を用いて培養することで、従来のハンギング・ドロップ法のES細胞の培養における、煩雑な手法を用いるこ

前記PC類似基を有する重合体は、式(1)で表されるPC類似基を有するポリマーであれば良く、例えば、式(2)で表されるPC類似基含有単量体(M)の単独重合体、及び該単量体(M)と他の単量体との共重合体の少なくとも1種が好ましく挙げられる。

[0011] [化2]



式(2)中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び n は式(1)と同様であり、 R^4 は炭素数1～6のアルキル基を示し、 R^5 は水素原子又はメチル基を示す。

[0012] 式(2)で表される単量体(M)としては、例えば、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、3-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、4-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、5-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、6-((メタ)アクリロイルオキシ)ヘキシル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリエチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリプロピルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリブチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリシクロヘキシルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリフェニルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ヘキシル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート等が挙げられる。

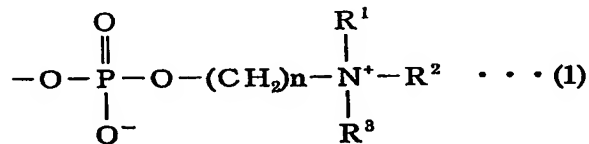
[0013] 中でも2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェートが好ましく、さらに2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-(トリメチルアンモニオ)

請求の範囲

[1] (補正後) 胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器であって

胚性幹細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、式(1)で表されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器。

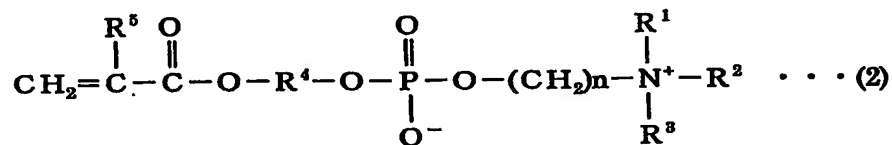
[化1]



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。 n は1～4の整数である。)

[2] (補正後) ホスホリルコリン類似基を有する化合物が、式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体(M)の単独重合体、及び該単量体(M)と他の単量体との共重合体の少なくとも1種である請求項1の胚様体形成用容器。

[化2]



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であつて、水素原子、炭素数1～6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を、 R^4 は炭素数1～6のアルキル基を、 R^5 は水素原子又はメチル基を示す。 n は1～4の整数である。)

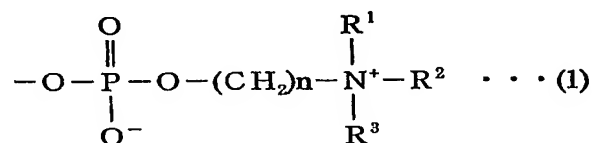
[3] 前記被覆層を形成した容器表面における、X線高電子分光分析によって測定した
 スペ

クルに基づくリン元素の量Pと炭素元素の量Cとの比(P/C)が、0.002~0.3である請求項1の胚様体形成容器。

[4](補正後)胚性幹細胞を浮遊培養するための領域を形成するための容器表面に、式(1)で表

されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様
体形成用容器を準備する工程(A)と、

[173]

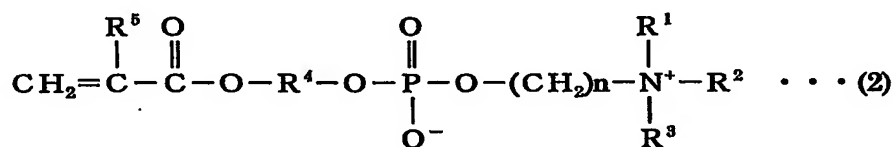


(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であつて、水素原子、炭素数1～6のア
ルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。 n は1～4の整数である。)

胚様体形成用容器内において、胚様体を形成するために胚性幹細胞を浮遊培養する工程(B)とを含む胚様体の形成方法。

[5] (補正後)ホスホリルコリン類似基を有する化合物が、式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体(M)の単独重合体、及び該単量体(M)と他の単量体との共重合体の少なくとも1種である請求項4の形成方法。

[化4]



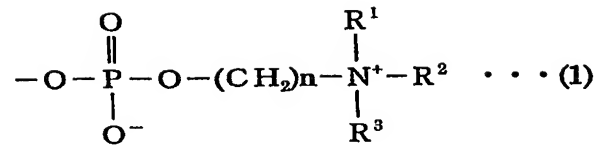
(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であつて、水素原子、炭素数1～6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を、 R^4 は炭素数1～6のアルキル基を、 R^5 は水素原子又はメチル基を示す。 n は1～4の整数である。)

[6] 前記被覆層を形成した容器表面における、X線高電子分光分析によって測定した
スペ

クトルに基づくリン元素の量Pと炭素元素の量Cとの比(P/C)が、0.002~0.3である請求項4の形成方法。

[7](補正後) 胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様体を形成するための胚様体形成用容器の使用であつて、該容器の胚性幹細胞を浮遊培養するための領域を形成する表面に、式(1)で表されるホスホリルコリン類似基を有する化合物を用いて形成した被覆層を備える胚様体形成用容器の使用。

[化5]



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は同一もしくは異なる基であつて、水素原子、炭素数1～6のアルキル基又はヒドロキシアルキル基を示す。 n は1～4の整数である。)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.